

两种检测柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体胶体金方法的建立及比较

阎建栋¹ 郭斌¹ 华艳²

(1. 太原市第四人民医院, 山西 太原 030053; 2. 北京英诺特生物技术有限公司, 北京 100070)

[摘要] 目的: 建立两种胶体金反应体系检测柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体并进行比较, 选出合适的检测方法。方法: 利用胶体金标记柯萨奇重组抗原做金标垫, 鼠抗人 IgG 包被做检测线建立捕获法反应体系; 利用胶体金标记鼠抗人 IgG 做金标垫, 包被柯萨奇重组抗原做检测线建立间接法反应体系, 通过实验选出性能较好的试剂盒并与进口试剂盒(酶联免疫法)进行临床标本比对实验。结果: 捕获法同临床已知样本的阳性符合率和阴性符合率分别为97.96%和98.80%, 总符合率达到98.67%, 间接法同临床已知样本的阳性符合率和阴性符合率分别为93.88%和98.80%, 总符合率达到98.00%; 在抗干扰实验中, 捕获法与间接法对 ANA 阳性、高脂、黄疸共 47 例干扰因子样本均有较好的抗干扰性能; 但在检测 RF 阳性样本时, 间接法体系研制而成的试剂出现 1 例假阳性反应; 对 600 例临床样本进行检测, 柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体捕获胶体金检测试剂与进口试剂盒的阳性符合率和阴性符合率分别为97.82%和99.40%, 总符合率达到99.17%。结论: 经初步临床应用, 表明利用捕获法原理建立的检测试剂盒比利用间接法建立的更灵敏, 抗干扰性能更强, 而且与进口试剂盒比对, 有较高的灵敏度和特异性, 具有较好的应用前景。

[关键词] 柯萨奇病毒 B 组; 捕获法; 间接法; 胶体金法

[中图分类号] R446.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-0126(2015)02-0015-04

Establishment and Comparison of Two Different Methods of Testing Coxsackievirus B IgG Antibody

YAN Jiandong¹, GUO Bin¹, HUA Yan²

(1. The Fourth People's Hospital of Taiyuan City, Taiyuan 030053, Shanxi, China; 2. Beijing Ying Nuo Te Biotechnology Co. Ltd. Beijing 100070, China)

[ABSTRACT] Objective: To establish two kinds of colloidal gold reaction system to detect coxsackievirus B IgG antibody with the appropriate method chosen through comparison. **Method:** Using the coxsackievirus B recombinant antigen labeled with colloidal gold as the conjugate pad, the test line was packed with the monoclonal antibody to human IgG to build the capture reaction system; Using the monoclonal antibody to human IgG labeled by colloidal gold on the pad, the test line was packed with the recombinant antigen to build the indirect reaction system. **Results:** The colloidal gold capture kit had a positive coincidence rate of 97.96%, negative coincidence rate of 98.80%, crude consistency of 98.67%; the colloidal gold indirect kit had a positive coincidence rate of 93.88%, negative coincidence rate of 98.80%, crude consistency of 98.00%. In the interference test, testing of 47 serum samples indicated that both of them had good interference ability, only one false positive result occurred using the colloidal gold indirect kit. Testing of 600 serum samples indicated that this colloidal gold capture kit had a sensitivity of 97.82%, specificity of 99.40%, crude consistency of 99.17%, compared to the imported CVB-IgG ELISA kit; **Conclusion:** As can be seen in the preliminary clinical use, the colloidal gold capture kit has higher sensitivity and more capacity than the indirect one by the experiments. Compared to imported reagents, the colloidal gold capture kit has higher sensitivity and specificity with a good prospects.

[KEYWORD] coxsackie virus B; capture; indirect method; colloidal gold

[作者简介] 阎建栋, 男, 医师, 从事呼吸内科及结核病临床研究

柯萨奇病毒 B 组(coxsackievirus B ,CVB) 是 1954 年在美国纽约州柯萨奇镇被发现的,是微小 RNA 病毒科肠道病毒属成员,有 6 个血清型,病毒侵犯不同的器官而临床病症表现各异^[1-2],可引起从上呼吸道到中枢神经系统感染的许多疾病。是引起人类病毒性心肌炎、无菌性脑膜炎和新生儿全身性感染等疾病的主要病原,可在世界各地散发或暴发流行,近年来其发病呈显著上升趋势。病毒性心肌炎的病例中大约有 20% ~ 25% 是由柯萨奇病毒 B 组引起^[3]。近年研究显示 1、2 型糖尿病的发生也与柯萨奇病毒 B 组的感染有一定相关性^[4]。CVB 的致病机制十分复杂,病毒基因组以及病毒蛋白均在病毒致病过程中发挥重要作用^[5]。

病毒的携带者及患者均为传染源。病毒主要从粪便中排出,也可从咽喉部排出,主要通过肠道传播,也可经污染的手、食品、衣服、用具等传播。在婴儿室内柯萨奇病毒感染患儿、医护人员以及哺乳的产妇均可成为本病散发或流行的传染源^[6]。因此柯萨奇病毒 B 组病毒感染的检测对疾病的预防及治疗具有重要的意义。

1 实验材料

1.1 原料

柯萨奇病毒重组抗原购自北京铂莱瑞生物技术有限公司。

1.2 试剂盒

柯萨奇 B 组病毒 IgG 抗体检测试剂盒,购自北京贝尔生物工程有限公司;柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体检测试剂盒(酶联免疫法),购自北京现代高达生物技术有限公司;柯萨奇病毒 IgG 试剂盒为进口试剂盒,购自 VIRION (U. S.)。

1.3 血清样本

收集 2013 年 10 月太原市第四人民医院 300 例经确认的门诊及住院患者血清样本,主要包括咽炎、肺炎、支气管炎等呼吸道感染患者的血清样本,其中阳性 49 例,阴性 251 例。

收集 47 例干扰因子,其中抗核抗体(ANA) 阳性血清样本 12 例、类风湿因子(RF) 阳性血清样本 15 例、高脂血清样本 10 例、黄疸血清样本 10 例。

另外,从不同医院随机收集 600 例具有疑似呼吸道感染症状的患者血清样本,多数为青少年及婴幼儿血清。

2 实验方法

2.1 最佳反应体系的选择

2.1.1 间接法反应体系的建立 按经典的氯化金-柠檬酸三钠还原法制备胶体金液。用柯萨奇重组抗原和羊抗鼠 IgG 单克隆抗体包被硝酸纤维素膜,并用方正滴定法确定最佳包被浓度,胶体金标记鼠抗人 IgG (抗 γ 链) 抗体和小鼠 IgG 抗体为示踪物,加入待检血清,观察检测线和质控线位置颜色的变化。

2.1.2 捕获法反应体系的建立 按经典的氯化金-柠檬酸三钠还原法制备胶体金液。用鼠抗人 IgG(抗 γ 链) 抗体和羊抗鼠 IgG 单克隆抗体包被硝酸纤维素膜,并用方正滴定法确定最佳包被浓度,胶体金标记柯萨奇重组抗原和小鼠 IgG 抗体为示踪物,加入待检血清,观察检测线和质控线位置颜色的变化。

2.1.3 两种反应体系的性能比较 通过对 300 例经北京贝尔公司和北京高达公司试剂盒确认阴阳性的样本同时进行检测,分别计算阳性符合率和阴性符合率,同时对 47 例干扰因子分别进行抗干扰实验。

2.2 与进口试剂盒的性能比较

通过比较选择性能较好的反应体系与 VIRION (U. S.) 生产的柯萨奇病毒 IgG 试剂盒对临床随机样本进行对比检测。

3 结果

3.1 最佳反应体系的建立

3.1.1 间接法反应体系的建立 用柯萨奇病毒 B 组重组抗原和羊抗鼠 IgG 单克隆抗体包被硝酸纤维素膜,包被浓度为 1.0 mg/mL,包被量为 1.0 μ L/cm。

胶体金标记鼠抗人 IgG(抗 γ 链) 抗体和小鼠 IgG 抗体为示踪物,经实验确认,鼠抗人 IgG(抗 γ 链) 抗体金标记物喷点量为 50.0 μ L/cm²,小鼠 IgG 金复合物最佳包被量为 16.0 μ L/cm²,最佳反应时间为 20 min。

3.1.2 捕获法反应体系的建立 用鼠抗人 IgG(抗 γ 链) 和羊抗鼠 IgG 单克隆抗体包被硝酸纤维素膜,包被浓度都为 1.0 mg/mL,包被量为 1.0 μ L/cm。

胶体金标记柯萨奇病毒 B 组重组抗原和小鼠 IgG 抗体为示踪物,经实验确认,最终选择柯萨奇病毒 B 组重组抗原金标记物喷点量为 60.0 μ L/cm²,小鼠 IgG 金复合物最佳包被量为 14.0 μ L/cm²,反应时间为 20 min。

3.1.3 两种反应体系性能的判定比较 用间接法和捕获法建立的柯萨奇 B 组病毒 IgG 抗体胶体金检测试剂与北京贝尔生物技术有限公司的柯萨奇 B 组病毒 IgG 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)对 300 例血清样本和 47 例干扰因子样本分别进行对比检测,结果见表 1~3。

表 1 捕获法胶体金与贝尔酶免试剂对比检测结果 例

Table 1 Comparison of Results between the Capture CG Method and Biaer Elisa Kit case

捕获法胶体金试剂检测结果	北京贝尔酶免试剂检测结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	48	3	51
阴性	1	248	249
合计	49	251	300

北京英诺特生物技术有限公司根据捕获法反应体系研制的《柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)》检测结果与贝尔公司试剂检测结果具有较高的符合性,阳性符合率为 97.96%,阴性符合率为 98.80%,总体符合率 98.67%,Kappa 值为 0.95。见表 1。

表 2 间接法胶体金试剂与贝尔酶免试剂对比检测结果 例

Table 2 Comparison of Results between the Indirect CG Method and Biaer Elisa Kit case

间接法胶体金试剂检测结果	北京贝尔酶免试剂检测结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	46	3	49
阴性	3	248	251
合计	49	251	300

表 2 数据表明,北京英诺特生物技术有限公司根据间接法反应体系研制的《柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)》临床检测结果与贝尔公司试剂检测结果具有较高的符合性,阳性符合率为 96.13%,阴性符合率为 98.99%,总体符合率 98.56%,Kappa 值为 0.94。

表 3 两种体系抗干扰实验

Table 3 Comparison of Anti-interference Results between Two Systems case

样本特点	例数	酶免法检测结果		间接法检测结果		捕获法检测结果	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
ANA 阳性	12	0	12	0	12	0	12
高脂	10	0	10	0	10	0	10
RF 阳性	15	0	15	1	14	0	15
黄疸	10	0	10	0	10	0	10
合计	47	0	47	1	46	0	47

表 3 结果显示,捕获法与间接法对 ANA 阳性、高脂、黄疸等样本均有较好的抗干扰性能;但在检测 RF 阳性样本时,根据间接法体系研制而成的胶体金试剂出现了 1 例假阳性结果。虽然不排除该样本本身所含 IgG 抗体含量造成的误差,但捕获法在抗原抗体反应中,仅针对特异性抗 COX-B IgG 抗体进行捕捉,抗干扰能力更强。

3.2 与进口试剂盒的判定比较

用 VIRION (U. S.) 生产的柯萨奇病毒 IgG 试剂盒与北京英诺特生物技术有限公司根据捕获法反应体系研制的《柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)》对临床收集的 600 例血清样本进行对比检测,结果见表 4。

数据表明,北京英诺特生物技术有限公司研制的《柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)》临床检测结果与 VIRION 公司试剂检测结果具有较高的符合性,阳性符合率为 97.92%,阴性符合率为 99.40%,总体符合率 99.17%,Kappa 值为 0.97,具有高度一致性。

表 4 捕获法与 VIRION 试剂盒临床标本比对结果 例

Table 4 Comparison of Results between the Capture Method and VIRION Kit case

捕获法胶体金试剂检测结果	VIRION 酶免试剂检测结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	94	3	97
阴性	2	501	503
合计	96	504	600

4 讨论

目前科萨奇病毒感染的检测方法主要有病毒分离、血清学检测和 PCR 检测及斑点杂交。其中病毒分离需要选择孕母及患儿的早起分泌物(咽拭子、直肠拭子、便、血液、脑脊液及组织细胞等)进行分离培养,以提高病原体的阳性检出率。而国内外学者从 80 年代开始就将分子病毒学技术应用于病毒病原学诊断,用核酸杂交的方法检测血清及心肌标本中的肠道病毒 DNA 及 RNA^[7]。此方法敏感性强,特异性高且具有快速的特点,但由于这两种方法对专业技术和设备都有很高的要求,无法广泛使用。

而血清学检查具有简便快速的特性使其在临床上得到广泛应用 现在 CVB 血清学检查主要应用的方法有中和实验和间接免疫荧光技术。但中和实验需要较长的检测周期 ,也不太适用于一般的临床应用。

目前国内市场上用于检测柯萨奇病毒 B 组感染的血清学试剂非常稀少 ,并且都采用酶联免疫学方法来检测 CVB-IgG。但该法检测所需时间长 ,操作步骤繁琐、易受类风湿因子等因素的影响 ,所以结果不稳定。而胶体金法与酶联免疫分析法比较具有便捷、快速、操作简单等多方面的优点。

本次研究根据间接法和捕获法原理分别研制的《柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)》,对临床样本和干扰因子进行对比检测。结果表明 根据捕获法原理研制的《柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)》具有更高的灵敏度和抗干扰能力 ,并通过与 VIRION (U. S.) 生产的柯萨奇病毒 IgG 试剂盒进行比较 ,阳性符合率为97.92% ,阴性符合率为99.40% ,总体符合率99.17% ,Kappa 值为 0.97。研究结果表明 北京英诺特生物技术有限公司采用捕获法研制的《柯萨奇病毒 B 组 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)》能有效抗干扰 ,灵敏度、特异性与进口同类

产品具有高度的一致性 ,而且操作方便、快速、节约成本 检测结果的判定不需要其他设备 ,具有很好的应用价值。

[参考文献]

- [1] 胡开华,黄开琼,邱练芳,等. 成都市成人病毒性心肌炎的柯萨奇 B 组病毒病原学的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1992, 6(2): 193-195.
- [2] 赵锦铭,丁韵珍,王树欣,等. 北京地区病毒性心肌炎的病毒病因研究[J]. 中华儿科杂志, 1984, 22(4): 167.
- [3] 孙灵梅,姜淑华,孙桂芳,等. 柯萨奇 B 组病毒感染对上呼吸道感染患儿病程的影响[J]. 滨州医学院学报, 2004, 27(1): 63-64.
- [4] 温江涛,赵长李,世宝新,等. 柯萨奇病毒 B 组和人巨细胞病毒感染与 1、2 型糖尿病的相关性研究[J]. 中华临床医师杂志, 2014, 8(16): 101-105.
- [5] 刘发娣,黄孝天,刘金辉. 柯萨奇 B 组病毒致病性的分子生物学研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2010, 7(1): 70-73.
- [6] 李娟,魏秀清,魏克伦. 围生儿柯萨奇病毒感染的流行病学及其临床特点[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21(6): 332-333.
- [7] 姜庆利. 检测柯萨奇病毒、副流感病毒基因芯片的建立[D]. 长春: 吉林大学, 2013.

本文编辑: 王知平

实施早期干预预防阴道分娩产后出血的临床观察

王秀花,宋文爱,杨丽珍

(介休市人民医院 山西 介休 032000)

[摘要] 目的: 观察阴道分娩中实施早期干预预防产后出血的临床效果。方法: 选取介休市人民医院实施早期干预前后 2 个不同阶段的分娩人数最多的两年做回顾性总结 2014 年阴道分娩的产妇 2 077 例作为观察组, 2009 年阴道分娩的产妇 1 980 例作为对照组。观察组在产前认真评估、建立静脉通道,胎头娩出后立即缩宫素 20 U 加入液体中快速(或 250 mL/h) 点滴,胎盘娩出后产前有发生产后出血高危因素者子宫体及子宫颈收缩不好有出血倾向者即刻肛门塞米索前列醇 0.4 mg 片等干预,对照组胎头娩出后肌注缩宫素 20 U,胎盘娩出后出血多时予建立静脉通道点滴缩宫素 20 U 等治疗。观察两组出血量、产后出血的发生率。结果: 观察组阴道出血量明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),产后出血发生率明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 及早采取干预措施对预防产后出血是积极有效的。

[关键词] 早期干预; 阴道分娩; 产后出血

[中图分类号] R714.4

[文献标识码] B

[文章编号] 1671-0126(2015)02-0018-03

产后出血指胎儿娩出后 24 h 内失血量超过 500 mL,剖宫产时超过 1 000 mL^[1],是产科严重并发

症之一,常危及着产妇的生命。为了预防产后出血的发生、减少出血量、减少输血量、保留子宫、降低孕产妇

[作者简介] 王秀花,女,主治医师,从事妇产科临床工作